

Title	筋肉におけるバリンの作用メカニズム解明に向けた mTORの機序解明
Author(s)	
Citation	令和2（2020）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書
Issue Date	2021-04
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/80646
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

令和 2 年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書					
ふ り が な 氏 名	いずたに りな 泉谷 里奈	学部 学科	薬学部 薬学 科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	なかもと ゆりな 仲本 有里菜	学部 学科	薬学部 薬学 科	学年	3 年
	こばやし じゅんだい 小林 純大		薬学部 薬科 学科		3 年
	つじい ゆうき 辻井 勇氣		薬学部 薬科 学科		3 年
	にしむら あきひで 西村 哲秀		薬学部 薬科 学科		3 年
アドバイザー教員 氏名	堤 康央	所属	薬学部		
研究課題名	筋肉におけるバリンの作用メカニズム解明に向けた mTOR の機序解明				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【背景・目的】

昨今のコロナ禍も相俟って、健康志向が高まる中、必要な栄養素を確保するため、サプリメントやプロテイン飲料の消費が年々増加している。サプリメントやプロテイン飲料には、BCAA（Branched Chain Amino Acid；分岐鎖アミノ酸）と呼ばれる、バリン・ロイシン・イソロイシンが含まれており、これらは運動時の筋肉でのエネルギー源と言われている¹。中でもロイシンは、mTOR シグナルを活性化することで、骨格筋の成長、修復、再生に重要な役割を果たしている筋衛星細胞の活性化と増殖を行っていることが報告されている²。また、イソロイシンについてもタンパク質の合成を促進させること、およびそのメカニズム解明が進んでいる。一方、バリンの作用メカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究では、バリンが筋肉の増強に及ぼす影響とメカニズムの基礎解明に挑戦した。

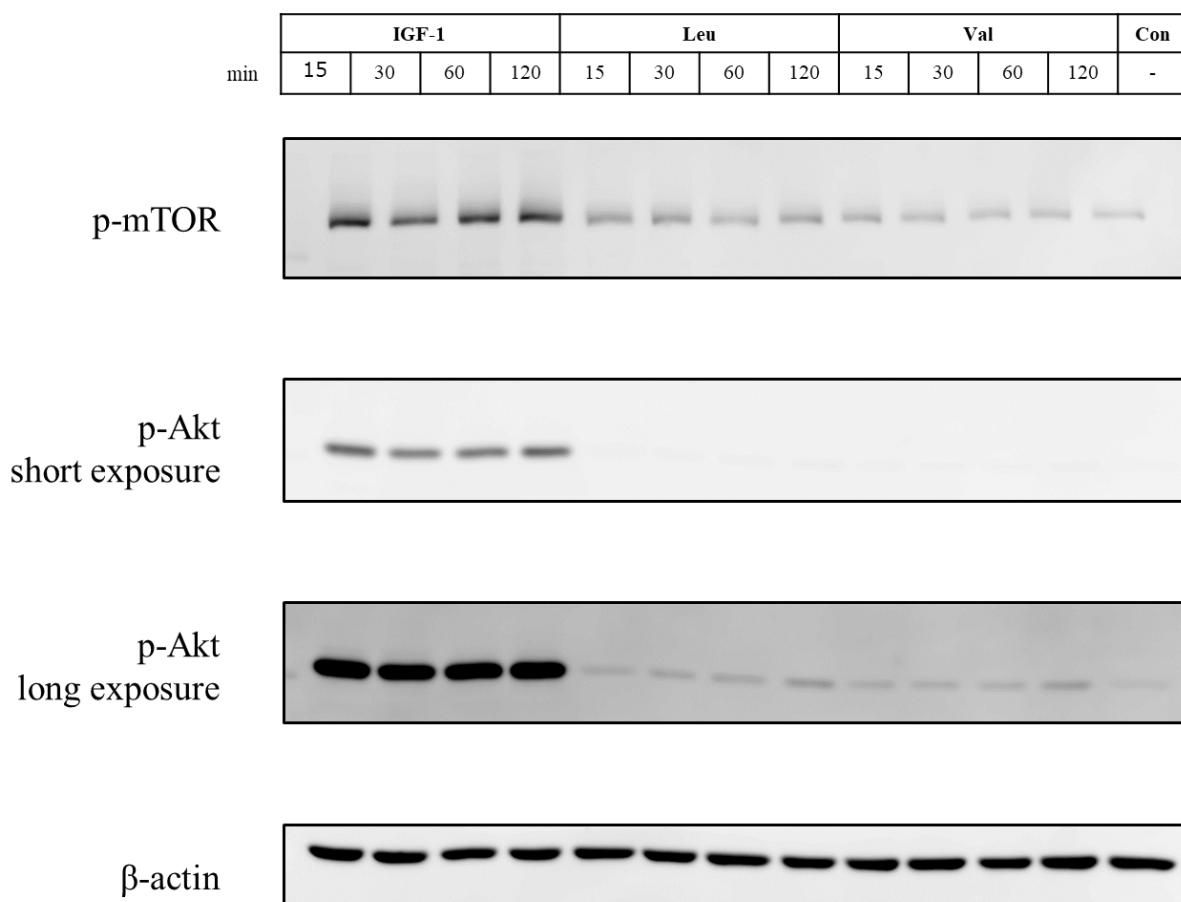
【方法】

バリンの摂取による、マウス横紋筋細胞株(C2C12)における mTOR シグナル活性化に関与する因子の発現変動を、ウェスタンブロッティングで測定することにより、バリンがロイシンと同様に mTOR シグナルを活性化するのかを評価した。

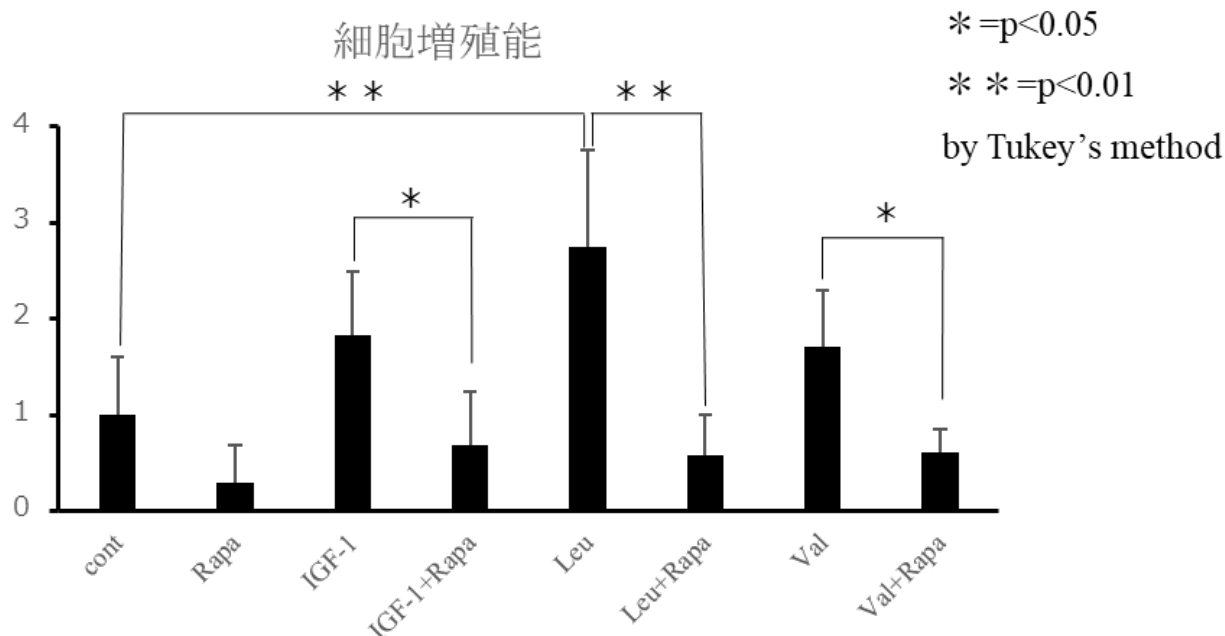
さらに、mTOR を阻害した場合の、バリン摂取による C2C12 の増殖能の変動を MTT アッセイで評価することにより、バリンが mTOR シグナルを介して C2C12 の増殖を誘導するのかを評価した。

【結果】

C2C12 に Insulin-like growth factor 1(IGF-1) ,ロイシン(Leu),バリン(Val)を 15,30,60,120 分添加した際の p-mTOR, p-Akt 活性をウェスタンブロッティングで評価した。p-mTOR に関して、ロイシンとバリンにおいては、大きな変化は見られなかった。p-Akt に関してロイシン,バリン共に 120 分で同等の活性上昇があることが示唆された。



また、mTOR 阻害剤であるラパマイシン(Rapa)を C2C12 に投与し MTT アッセイを行い、細胞の増殖が mTOR 経路によるものかを評価した。下に示す結果は、C2C12 に各種試薬を 48 時間添加した際の結果である。IGF-1,ロイシン,バリンのそれぞれにおいて、ラパマイシンと共投与した際の活性が有意に低下していることから、ロイシン、バリンにおける C2C12 の細胞増殖効果が mTOR 経路によるものであることが示唆された。



【考察】

本実験により、バリンを C2C12 に添加すると、p-Akt の上昇とラパマイシンとの共投与による増殖能の低下が確認できた。このことより、バリンもロイシンと同様に、mTOR 経路が細胞の増殖と活性化に寄与していることが示唆された。しかし、本実験ではロイシン、バリン共にウェスタンブロッティングにおいて p-mTOR の活性は確認することができなかった。mTOR は Akt のシグナル経路の下流に位置する分子である。ウェスタンブロッティングにおいて p-Akt が 120 分で発現が増加しているため、p-mTOR に関しては 120 分以降で発現が増加していることが考えられる。このことより、ロイシン、バリンを 120 分以上作用させたウェスタンブロッティングを行うことでさらに詳細な情報が収集できると考えられる。

IGF-1 は 15 分と比較的短い時間で p-Akt, p-mTOR とともに発現が上昇しているが、これは IGF-1 が細胞膜に存在する受容体に結合するとすぐにシグナルを伝達するからだと考えられる。一方ロイシン、バリンは細胞膜に存在するアミノ酸トランスポーターによって細胞内に入った後、複雑な経路を介して mTOR 経路を活性化すると考えられるので、120 分と IGF-1 よりも長い時間で p-Akt が活性化したと考えられる。ウェスタンブロッティングでは IGF-1 のほうがより p-mTOR を活性化しているが MTT アッセイではロイシンが IGF-1 と同等以上の活性を示している。これは、MTT アッセイがミトコンドリア内の脱水素酵素をもとに測定を行っているためミトコンドリアの活性が反映されてしまうことが原因の一つとして挙げられる。IGF-1 は受容体のみに作用するが、ロイシンなどのアミノ酸はトランスポーターで細胞内に輸送されるため、ミトコンドリアにも影響を与えるためであると考えられる。そのため、今後は、ミトコンドリア活性に依存しない、Thymidine Assay を用いて、今回得られた結果の正当性を確認したいと考える。

【参考文献】

1. Santos CS, et al., Isolated branched-chain amino acid intake and muscle protein synthesis in humans: a biochemical review. Einstein (Sao Paulo). 2019
2. Bing Han et al., Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and leucine activate pig myogenic satellite cells through mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Molecular Reproduction.2008

【謝辞】

本研究を実施するに際し、細胞生理学（微生）分野・筋幹細胞創薬プロジェクトの深田宗一郎先生には多方面からご指導を頂きました。この場をお借りして御礼を申し上げます